

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Japanese Application of

Takashi TSURUO, et al.

RECEIVED
JAN 16 2001
PATENT TRADEMARK OFFICE

Japanese Patent Application No.: 361282/1997

Japanese Patent Filing Date: December 26, 1997

RECEIVED
JAN 19 2001
TECH CENTER 1600/2000

for: "TELOMERASE INHIBITOR"

VERIFICATION OF TRANSLATION

Honorable Commissioner of Patents and Trademarks

Washington, D.C. 20231

Sir:

Jun NAKAGAWA residing at 1-1607-5, Kashiwaicho, Ichikawa-shi, Chiba, Japan, declares:

- (1) that he knows well both the Japanese and English languages;
- (2) that he translated the above-identified Japanese Application from Japanese to English;
- (3) that the attached English translation is a true and correct translation of the above-identified Japanese Application to the best of his knowledge and belief; and
- (4) that all statements made of his own knowledge are true and that all statements made on information and belief and believed to be true, and further that these statements are made with the knowledge that willful false statements and the like are punishable by fine or imprisonment, or both, under 18 USC 1001, and that such false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issuing thereof.

February 15, 2000
Date

Jun Nakagawa
Jun NAKAGAWA

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this office.

Date of Application: December 26, 1997

Application Number: Patent Application No. 361282/1997

Applicant(s): JAPANESE FOUNDATION FOR CANCER RESEARCH
Takashi TSURUO
ITO EN, Ltd.

December 25, 1998

Commissioner, Takeshi ISAYAMA (seal)

Patent Office

Shussho No. Shusshotokuhei 10-3103414

[Document Name] Patent Application
[Docket Number] P972431
[Filing Date] December 26, 1997
[To] Commissioner, Patent Office
[International Classification] C12N 9/00
[Title of the Invention] TELOMERASE INHIBITOR
[Number of Claims] 8
[Inventor]
[Address or Domicile] 3-36-6, Miyasaka, Setagaya-ku, Tokyo
[Name] Takashi TSURUO
[Inventor]
[Address or Domicile] 301, Royal Annex, 2-6-2, Higashiikebukuro, Toshima-ku, Tokyo
[Name] Naasani IMADO
[Inventor]
[Address or Domicile] 4-24-10-602, Towa, Adachi-ku, Tokyo
[Name] Hiroyuki SEIMIYA
[Inventor]
[Address or Domicile] 4-8-13, Minamiogikubo, Suginami-ku, Tokyo
[Name] Haruo SUGANO
[Applicant]
[Identification Number] 000173588
[Name or Appellation] Japanese Foundation For Cancer Research
[Applicant]
[Identification Number] 591031452
[Name or Appellation] Takashi TSURUO
[Applicant]
[Identification Number] 591014972
[Name or Appellation] ITO EN, Ltd.

[Agent]

[Identification Number] 100070219

[Patent Attorney]

[Name or Appellation] Tadashi WAKABAYASHI

[Telephone Number] 03-3585-1882

[Agent]

[Identification Number] 100100893

[Patent Attorney]

[Name or Appellation] Masaru WATANABE

[Agent]

[Identification Number] 100088328

[Patent Attorney]

[Name or Appellation] Nobuyuki KANEDA

[Agent]

[Identification Number] 100106138

[Patent Attorney]

[Name or Appellation] Masayuki ISHIBASHI

[Agent]

[Identification Number] 100106297

[Patent Attorney]

[Name or Appellation] Katsuhiro ITO

[Indication of Official Fees]

[Advance Deposit Record Number] 015129

[Amount paid] 21000

[List of Materials Submitted]

[Material Name] Specification 1

[Material Name] Drawings 1

[Material Name] Abstract 1

[Proof] Required

[Document Name] SPECIFICATION



[Title of the Invention] TELOMERASE INHIBITOR

[Claims]

[Claim 1] A telomerase inhibitor characterized in that a catechin is an effective component.

[Claim 2] A telomerase inhibitor of claim 1 wherein the catechin is epigallocatechin gallate, epigallocatechin, epicatechin gallate, or epicatechin.

[Claim 3] A telomerase inhibitor of claim 1 or 2 further comprising pharmaceutically acceptable carriers or diluents.

[Claim 4] A telomerase inhibitor of either one of claims 1 to 3 wherein the catechin content is 90 to 95% by weight.

[Claim 5] A cancer prevention or anticancer agent characterized in that a catechin is an effective component.

[Claim 6] A cancer preventing or anticancer agent of claim 5 wherein the catechin is epigallocatechin gallate, epigallocatechin, epicatechin gallate, or epicatechin.

[Claim 7] A cancer prevention or anticancer agent of claim 5 or 6 further comprising pharmaceutically acceptable carriers or diluents.

[Claim 8] A cancer prevention or anticancer agent of either one of claims 5 to 7 wherein the catechin content is 90 to 95% by weight.

[Detailed Explanation of the Invention]

[0001]

[Fields to which the Invention belongs]

The present invention relates to a telomerase inhibitor which uses catechins as an effective component and is useful as a cancer prevention agent, anticancer agent, agent to delay cancer progression, or the like.

[0002]

[Prior Art]

Various surgical, internal and, radiological antineoplastic procedures, and combinations thereof have been developed for the treatment of cancer. Extensive investigations are also being done to prevent cancer or on prophylactic means to regard the progression of a cancer as much as possible so as to prevent its transition to the fatal stage. Yet in all cases, it is evident that a further understanding as to the mechanism of the genesis and progression of cancers is essential in order to develop effective methods for their prevention and treatment.

[0003]

Recently, the presence of an enzyme called telomerase has drawn attention as

a new target in cancer therapy. This telomerase, a reverse transcriptase, synthesizes the telomeric DNA (hereinafter referred to as telomere) which is involved in the stabilization of a chromosome during cell growth. This telomere is a segment composed of a linear DNA at the end of the chromosome, and the presence of the telomere stabilizes the chromosome itself and prevents aberrations caused by binding between chromosomes.

[0004]

Research has revealed that telomeres in human tissues are shortened with age, and that cells die as this shortening progresses; thus the involvement of telomeres with the aging process and cell division cycle has become clear. Furthermore, it has been reported that telomeres in cancer cells are shorter than those in surrounding normal cells, which has further drawn attention to the telomere as an interesting target in cancer research.

[0005]

Moreover, it has been reported that activity of telomerase, a telomere-synthesizing enzyme, was detected in cells of 85% of all cancers (for example, Kim, N.W. et al., *Science*, 266, 2011-2015, 1994; Healy, K.C., *Oncol. Res.*, 7, 121-130, 1995; Raymond, E. et al., *Biotechnology*, 7, 583-591, 1996). In contrast, almost all normal somatic cells are known to be telomerase negative. On the basis of these observations, telomere and telomerase have drawn further attention as potential targets in cancer treatment.

[0006]

Meanwhile, effect of tea in the prevention and control of cancer is being studied. Yang et al. (Yang, C.S. and Wang, Z-Y., *J. Natl. Cancer Inst.*, 85, 1038-1049, 1993) and Fujiki et al. (Fujiki, H. et al., *Nutrition Reviews*, 54, 67-70, 1996) describe summarized discussion as to the anticancer effect of green tea from the epidemiological point of view. Furthermore, Liao et al. (Liao, S. et al., *Cancer Letter*, 96, 239-243, 1995) reported that epigallocatechin gallate (EGCG) contained in tea effectively suppressed cancer cell growth in nude mice with experimentally-induced tumors. Further, Taniguchi et al. (Taniguchi, S. et al., *Cancer Letters*, 65, 51-54, 1992) reported that oral administration of EGCG suppressed metastasis of malignant melanoma cells. However, none of these reports described the mechanisms underlying these effects of green tea or EGCG on cancer. In particular, these reports did not mention the effects of green tea or EGCG on telomerase, or the mechanism of anticancer activity associated with telomerase.

[0007]

[Problems to be solved by the Invention]

Although the utility of a telomerase inhibitor in cancer treatment could be surmised based on the hypothesis that the inhibition of telomerase activity in a cancer cell renders its chromosome less stable thereby shortening the life span of the cancer

cell. However, there are no reports to date regarding a substance which has an effective telomerase inhibiting activity and properties satisfactory for pharmaceutical use. Nor is there a reported case in the life span of cancer cell was effectively shortened by the use of a telomerase inhibitor.

[0008]

The object of the present invention is to provide a telomerase inhibitor having telomerase inhibiting activity, which is useful in providing an understanding of not only the involvement of telomere and telomerase with cancer, but also its prevention and treatment, whereby the telomerase inhibitor has the safe and appropriate properties for pharmaceutical use.

[0009]

[Means for resolving the problems]

A telomerase inhibitor of the present invention is characterized in using or containing catechins as an effective component. A telomerase inhibitor of the present invention can be used as a reagent for use in various experiments on telomerase inhibition per se or those involving telomerase inhibition, and further as a cancer prevention agent, anticancer agent, or the like by preparing it in a pharmaceutical preparation. Further, by using a telomerase inhibitor of the present invention, the life span of cancer cells can be shortened to kill the cells, or the progression of cancer can be effectively controlled by arresting its growth and malignancy.

[0010]

[Embodiments to carry out the Invention]

Commercially available catechins, or catechins extracted and isolated from tea by a known method can be used as an effective component of a telomerase inhibitor of the present invention.

[0011]

Catechins from tea can be extracted and isolated, for example, by extracting tea leaves with hot water or a hydrophilic organic solvent, removing natural high molecule weight substances such as caffeine from the extract by extraction with chloroform, then further extracting with an organic solvent such as ethyl acetate to obtain a tea-catechin mixture, and finally isolating the catechins from this mixture by column chromatography using a hydrophilic organic solvent such as acetone as the eluant.

[0012]

Examples of catechins to be used in the present invention include (-) epigallocatechin gallate (EGCG), (-) epigallocatechin (EGC), (-) epicatechin gallate (ECG), (-) epicatechin (EC) and (+)catechin. Derivatives of these catechins can also be used to the extent that efficacy of the present invention can be attained. Of these catechins, epigallocatechin and epicatechin gallate are preferable, and

epigallocatechin gallate is particularly preferable.

[0013]

A telomerase inhibitor of the present invention can be prepared by incorporating a catechin as an effective component into an appropriate solvent, if necessary. Catechins can suitably be used by incorporating the catechin into an oil-in-water (O/W) emulsion, prepared, for example by mixing the catechin with a vegetable oil, emulsifying agent (e.g., Tween or Emulgene), and ascorbic acid (antioxidant), then lyophilizing the resulting emulsion. An example of the composition before lyophilization is 5% by weight vegetable oil, emulsifying agent, or the like, 0.1% by weight antioxidant, and 5% by weight catechin. A preferable catechin content in the inhibitor is preferably 90-95% by weight. The inhibitor can be diluted for use, if necessary.

[0014]

A pharmaceutical composition which contains a catechin having telomerase inhibiting activity as an active component can appropriately be used as a cancer prevention agent or carcinostatic agent. The carcinostatic effect includes the anticancer effect by which cancer cells are directly attacked, the effect by which the progression of cancer (malignancy) is retarded, or the like. A pharmaceutical composition having a catechin as an effective component can be formulated into various forms suited for the purpose of the treatment, by a conventional method using pharmaceutically acceptable carriers, diluents, or the like. Examples of such forms of pharmaceutical compositions include solid formulations such as tablets, pills, dispersible powders, granules, capsules, and suppositories, liquid formulations such as injections, suspensions, syrups, and emulsions, and semi-solid formulations such as plasters.

[0015]

The amount of a catechin used in a pharmaceutical composition as an effective component can be, for example, 100 to 500 mg (approximately 90 to 95% by weight of the composition) for a tablet or capsule. The dosage of a catechin used in a pharmaceutical composition can conveniently be determined as a function of the intended treatment, the nature of the condition being treated, or the like. For example, the dosage for adults can be in the range of about 500 to 2000 mg per day as the amount of effective chemical component. Furthermore, the above mentioned lyophilized O/W emulsion can appropriately be used as a formulation or as a material for formulations.

[0016]

Furthermore, various additives conventionally used in formulations can be incorporated in the pharmaceutical formulation of the present invention within a range so as not to inhibit the desired action of the catechin. Moreover, a telomerase inhibitor of the present invention could be rendered even more effective in the

treatment of cancer by the co-administration of a chemotherapeutic agent (anticancer agent) to the cancer cells being attacked by the telomerase inhibitor.

[0017]

A catechin, the effective component of the telomerase inhibitor of the present invention, can be obtained from tea components, is very safe, shows an effective activity in a small amount, and is very appropriate for use as a drug, particularly for the prevention or treatment of cancers in which telomerase is expressed.

[0018]

[Examples]

The present invention will be further illustrated by the following examples. Unless otherwise stated, "%" means "% by weight."

[0019]

Example 1

Measurement of telomerase inhibiting activity in cell-free system

Telomerase inhibiting activity of EGCG, EGC, ECG, and EC (all products of Sigma) was measured according to the Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP) method described by Kim et al. (Kim, N.W. et al., Science, 266, 2011-2015, 1994) as follows:

(1) Preparation of cell extract

Cells were washed with ice-cold PBS (phosphate buffered saline) and suspended again in PBS to count the cells. After centrifuging this cell suspension, the resulting cell mass was suspended in a TRAP assay buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0.5% CHAPS, 10% glycerine, 5 mM 2-mercaptoethanol, and 0.1 mM 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride hydrochlorine), then the suspension was quick-frozen with liquid nitrogen. After melting, the suspension was allowed to stand in an ice bath for 30 minutes for extraction, then the resulting extract was centrifuged to obtain the supernatant as a cell extract for activity measurement.

(2) Reaction and treatment after reaction

A test compound, TS primer (50 ng), 50 μ M dNTPs, and T4g32 protein (Behringer-Manheim) were added to a specified volume of the cell extract (corresponding to 200 to 1000 cells), and the admixture was incubated at 20°C for 30 minutes. After reaction, CX primer (100 ng) and an internal standard for PCR, ITAS (10^{-18} g), were added to the reaction solution, then PCR was performed in the presence of AmpliTaq DNA polymerase (2 U), i.e., (94°C, 40 seconds \rightarrow 50°C, 40 seconds \rightarrow 72°C, 60 seconds) x 35 cycles \rightarrow 72°C, 2 minutes, to obtain PCR products.

[0020]

Base sequences of the primers used in the abovementioned procedure are as follows:

TS primer:

5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3' (SEQ ID NO: 1)

CX primer:

5'-GTGCCCTAACCCCTTACCCCTTACCCCTAA-3' (SEQ ID NO: 2)

ITAS:

5'AATCCGTCGAGCAGAGTTGTGAATGAGGCCTCGAGGCTCTGAAG
AGAACGCACCCTGCTCAACCCCCAACCAGCGGCTGCCTAAGGTGGAGATCCT
GCGCAGTGCCATCCAGTACATTGAGCGCCTATTAGGGTAAGGGTAAGGGT
AAGGG-3' (SEQ ID NO: 3)

In the in vitro reaction system, telomerase performs addition synthesis of telomere at the 3' end of the TS primer. Of the 24 bases at the 3'-end side of the CX primer, 21 bases are identical to a telomere sequence, hence the telomere product can be amplified by PCR with a combination of TS primer and CX primer. The 5' end part and the 3' end part of the ITAS sequence are made identical to the TS primer sequence and the CX primer sequence, respectively.

(3) Detection and quantitative analysis of reaction products

The PCR products obtained in the abovementioned procedure were resolved by polyacrylamide gel electrophoresis and the resulting DNA bands stained with SYBR Green (Takara Shuzo) were detected by irradiation with a UV transilluminator.

The detected bands were photographed. The intensity of each band was quantitatively analyzed using the NIH Image 1.60 software program. Telomerase activity was expressed as the intensity of a sample band relative to that of the band corresponding to the ITAS fragment (control).

[0021]

Results are shown in Figure 1. From Figure 1, it is evident that EGCG has the highest inhibiting activity among the five catechins.

[0022]

Example 2

Telomerase inhibiting activity of EGCG

Telomerase activity in reaction solutions of 8 different EGCG concentrations ranging from 0.1 to 20 μ M was measured in the same manner as described in Example 1 except that a primer, PS, was used at two different concentrations. Results are shown in Figure 2. A Dixon plot was plotted from the results in Figure 2, which gave a K_i value of about 100 nM (see Figures 2 and 3).

[0023]

Example 3

Telomerase inhibiting activity in cells

The telomerase inhibiting activity of EGCG was assayed in monoblastoid leukemia U937 cells (American Type Culture Collection, ATCC) and colon adenocarcinoma HT29 cells.

[0024]

An RPMI1640 medium (Nissui) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) was used for U937 cells, and an RPMI1640 medium supplemented with 5% FBS and 5% fetal calf serum (FCS) was used for HT29 cells.

[0025]

The cells were incubated in a 15 μ M EGCG solution for 2 hours and washed in PBS. The washed cells were suspended in an RPMI1640 medium (without serum) at a concentration of 2×10^6 cells/ml, then Streptolysin O (Sigma, 5 U/ml), TS primer (10 μ M), spermidine (1 mM), and Imipramine (50 μ M) were added, and the admixture was incubated at room temperature for 10 minutes. Streptolysin O is a substance which increases the permeability of a substance through the cell membrane, and enables the TS primers and other substances to be incorporated into the cell.

[0026]

The permeabilization reaction was stopped by adding an equal volume of RPMI1640 medium supplemented with 10% FBS, after which the cell suspension was further incubated for 1 hour to seal the cell membrane. The cells thus obtained, in which TS primer and other substances were incorporated, were incubated at room temperature for 1 hour to coat the cell membrane, and at the same time, to allow the intracellular telomerase reaction to progress. The cells were then washed twice with PBS, pelleted, and frozen for a TRAP assay to detect telomerase products.

[0027]

Namely, the cells were washed with ice-cold PBS and suspended again in PBS to count the cells. This suspension was centrifuged, the resulting cell mass was suspended in a TRAP assay buffer, then the suspension was quick-frozen with liquid nitrogen. After melting, the suspension was allowed to stand in an ice bath for 30 minutes, then the resulting extract was centrifuged to obtain the supernatant as a cell extract. TS primer (344 nM), ACX primer (385 nM), 50 μ M dNTPs, T4g32 protein (Behringer-Manheim), an internal standard for PCR, TSNT (0.02 pM), and NT primer (385 nM) were added to a specified volume of the cell extract (corresponding to 200 to 1000 cells), then PCR was performed in the presence of Ampli Taq DNA polymerase (2 U), i.e., (94°C, 40 seconds \rightarrow 50°C, 40 seconds \rightarrow 72°C, 60 seconds) \times 35 cycles \rightarrow 72°C, 2 minutes, to obtain PCR products.

Base sequences of the primers used in this reaction are as follows.

ACX primer:

5'-GCGCGGCTTACCCTTACCCTTACCCTAACCC-3' (SEQ ID NO: 4)

TSNT:

5'-AATCCGTCGAGCAGAGTTAAAAGGCCGAGAACCGAT-3' (SEQ ID: NO. 5)

NT primer:

5'-ATCGCTTCTCGGCCTTT-3' (SEQ ID NO: 6)

[0028]

The telomerase products thus obtained were resolved by polyacrylamide gel electrophoresis, after which DNA bands were stained with SYBR Green (Takara Shuzo) and detected by irradiation with a UV transilluminator. The intensity of each band was quantitatively analyzed using the NIH Image 1.60 software program and telomerase activity was expressed as the intensity of a sample band relative to that of the band corresponding to the ITAS fragment (control).

[0029]

In the abovementioned PCR, a part elongated by telomerase was amplified using TS primer as the forward primer and ACX primer as the return primer. Further, the 36-bp internal standard (TSNT) and its own return primer (NT) were used as described by Kim et al. (Kim, N.W. and Wu, F., Nucleic Acids Res., 25, 2595-2597, 1997).

[0030]

Results are shown in Figure 4. The results in Fig. 4 showed that the treatment of the cells with EGCG markedly inhibited intracellular telomerase activity.

Minor signals were also detected in the absence of TS primer. These signals were deemed to be derived from endogenous telomere sequences, or the like, and was similarly inhibited by the EGCG treatment.

[0031]

Example 4

Mechanism of effect of EGCG on telomerase

The cells were treated with 15 μ M EGCG for 2 hours and washed with ice-cold PBS. The cell mass obtained by centrifugation was suspended in a TRAP assay buffer and the resulting suspension was quick-frozen with liquid nitrogen. After melting, the suspension was allowed to stand in an ice bath for 30 minutes, then the resulting extract was centrifuged to obtain the supernatant as a cell extract. A test compound, TS primer (50 ng), 50 μ M dNTPs, and T4g32 protein (Behringer-Manheim) were added to a specified volume of the cell extract (corresponding to 200 to 1000 cells), and the admixture was incubated at 20°C for 30 minutes. After reaction, CX primer (100 ng) was added to the reaction solution, then PCR was performed in the presence of Ampli Taq DNA polymerase (2 U) and ITAS (10^{-18} g), i.e., (94°C, 40 seconds \rightarrow 50°C, 40 seconds \rightarrow 72°C, 60 seconds) \times 35 cycles \rightarrow 72°C, 2 minutes, to obtain PCR products. The PCR products thus obtained were resolved by polyacrylamide gel electrophoresis and the resulting DNA bands stained with SYBR Green (Takara Shuzo) were detected by irradiation with a UV transilluminator. The intensity of each band was quantitatively analyzed using the NIH Image 1.60 software program. Telomerase activity was expressed as the intensity of a sample band relative to that of the band corresponding to the ITAS fragment.

[0032]

The abovementioned procedure was carried out for both U937 cells and HT29 cells. Results showed that the EGCG treatment of cells had no effect on telomerase activity, when tested in vitro because of the dilution effect during the solubilization of cells. This observation along with the results of Examples 1 to 3 revealed that EGCG directly and reversibly inhibited telomerase activity in the cells, and that this inhibition was not through the intracellular information transfer system (intracellular signaling pathway).

[0033]

Example 5

U937 cells and HT29 cells were each subcultured on a medium with and without EGCG to study the effect of addition of EGCG on cell growth. The medium used was the same as used in Example 3.

[0034]

Five subculture lines for U937 cells and nine subculture lines for HT29 cells were prepared. The first culture of each line was made by inoculating cells of each stock culture at a density of 5×10^5 cells per 10-cm dish. For each subculture, two lines were cultured on a medium without EGCG (control lines) and the rest of the lines were cultured on a medium supplemented with 15 μ M EGCG.

[0035]

Cells were passaged, sampled and counted every four days. The incubation medium was freshly changed every day.

[0036]

Results are shown in Figure 5 (U937 cells) and Figure 6 (HT29 cells). Symbol \circ shows the control line cultured on a medium without EGCG. In Figure 5, symbols \bullet , \blacktriangle , and \blacksquare show the lines cultured on a medium supplemented with 15 μ M EGCG. Cells of all the lines entered cell crisis at day 53 (\bullet), day 44 (\blacktriangle), and day 29 (\blacksquare), and thereafter showed morphological changes similar to cell senescence. In Figure 6, both symbols \blacktriangle and \bullet show the lines cultured on a medium supplemented with 15 μ M EGCG. Cells of both lines entered cell crisis at day 75 (\blacktriangle) and day 57 (\bullet), and thereafter showed morphological changes similar to cell senescence.

[0037]

U937 cells and HT29 cells entered crisis approximately at PD25 and PD60, respectively, showing characteristic morphological changes (rounding up and detachment for HT29 cells and raggedness of the plasma membrane for U937 cells).

U937 cells died at PD40 and HT 29 cells died at PD70. PD is the number of cycles in which the cell population doubles during cell growth and is calculated by monitoring cell counts using a hemocytometer.

[0038]

The form of the cells did not revert and was maintained when the cells with morphological changes were transferred and cultured on a medium without EGCG, which confirmed that the morphological changes were not temporary.

[0039]

HT 29 cells from PD57 to PD60 in cell crisis were pooled and the genomic DNA was prepared by a salting-out/ethanol precipitation method (Stratagene). Further, integrity of the isolated genomic DNA was confirmed by gel electrophoresis (ethidium bromide staining).

[0040]

The isolated genomic DNA (10 µg) was digested with *HinfI* and *RsaI* and the resulting digests were subjected to Southern blotting by the ordinary method, after which DNA fragments were detected using a TeloQuant assay kit (PharmMingen).

[0041]

Results are shown in Figure 7. While cleavage sites recognized by restriction enzymes *HinfI* and *RsaI* are numerous in a normal genomic DNA, such cleavage sites do not exist in the subtelomere or telomere region. Accordingly, if a genomic DNA is digested with the abovementioned restriction enzymes, only the telomere region would remain undigested. This DNA fragment is called the Terminal Restriction Fragment (TRF) which can be detected by Southern blotting to analyze telomere lengths. TRFs of EGCG-treated or untreated HT29 cells obtained as mentioned above were detected using a TeloQuant assay kit. Figure 7 shows the results of densitometric analysis of the detected signals. It was observed that TRFs in the cells which entered crisis due to the EGCG treatment (●) were shortened by about 1.1 kb as compared to those in the untreated cells(○). Further, it was confirmed that successive EGCG treatment of HT29 cells caused telomere diminishment.

[0042]

Further, analysis of DNA content of cells before entering crisis by the ordinary method using flowcytometry revealed a 50 to 100% and a 10 to 20% increase in the aneuploidy and cell cycle G2/M fractions, respectively, for both U937 cells and HT29 cells.

[0043]

In conclusion, it is evident from these results that cell crisis to death was caused by intracellular telomerase inhibition by EGCG.

[0044]

[Effects of the Invention]

Catechins used in the present invention have unconventionally strong telomerase inhibiting activity, and can provide a telomerase inhibitor which is useful in providing an understanding of the involvement of telomerase with a cancer, and its prevention and treatment, and which possesses the safe and appropriate properties for

pharmaceutical use.

[0045]

[Sequence Listing]

SEQ ID NO: 1

SEQUENCE TYPE: Nucleotide

SEQUENCE LENGTH: 18 bases

STRANDNESS: Single

TOPOLOGY: Linear

MOLECULE TYPE: Synthetic DNA

PROPERTIES: TS primer for PCR

SEQUENCE:

AATCCGTCGA GCAGAGTT 18

SEQ ID NO: 2

SEQUENCE TYPE: Nucleotide

SEQUENCE LENGTH: 28 bases

STRANDNESS: Single

TOPOLOGY: Linear

MOLECULE TYPE: Synthetic DNA

PROPERTIES: CX primer for PCR

SEQUENCE:

GTGCCCTTAA CCCTTACCCCT TACCCTAA

SEQ ID NO: 3

SEQUENCE TYPE: Nucleotide

SEQUENCE LENGTH: 150 bases

STRANDNESS: Single

TOPOLOGY: Linear

MOLECULE TYPE: Synthetic DNA

PROPERTIES: ITAS internal standard for PCR

SEQUENCE:

AATCCGTCGA GCAGAGTTGT GAATGAGGCC TTGAGGGCTC	40
TGAAGAGAAG CACCCTGCTC AACCCCAACC AGCGGCTGCC	80
TAAGGTGGAG ATCCTGCGCA GTGCCATCCA GTACATTGAG	120
CGCCTATTAG GGTAAGGGTA AGGGTAAGGG	150

SEQ ID NO: 4

SEQUENCE TYPE: Nucleotide

SEQUENCE LENGTH: 30 bases

STRANDNESS: Single

TOPOLOGY: Linear

MOLECULE TYPE: Synthetic DNA

PROPERTIES: ACX primer for PCR

SEQUENCE:

GCGCGGCTTA CCCTTACCCCT TACCCCTAACCC 30

SEQ ID NO: 5

SEQUENCE TYPE: Nucleotide

SEQUENCE LENGTH: 36 bases

STRANDNESS: Single

TOPOLOGY: Linear

MOLECULE TYPE: Synthetic DNA

PROPERTIES: TSNT internal standard for PCR

SEQUENCE:

AATCCGTCGA GCAGAGTTAA AAGGCCGAGA AGCGAT

SEQ ID NO: 6

SEQUENCE TYPE: Nucleotide

SEQUENCE LENGTH: 18 bases

STRANDNESS: Single

TOPOLOGY: Linear

MOLECULE TYPE: Synthetic DNA

PROPERTIES: NT primer for PCR

SEQUENCE:

ATCGCTTCTC GGCCTTTT 18

[Brief Description of the Drawings]

[Figure 1]

Figure shows the telomerase activity of different compounds.

[Figure 2]

Figure shows changes in telomerase activity as a function of EGCG concentration.

[Figure 3]

Figure shows a Dixon plot for the telomerase inhibiting activity of EGCG.

[Figure 4]

Figure shows the telomerase inhibiting activity of EGCG in a cell.

[Figure 5]

Figure shows the effect of EGCG on cell growth.

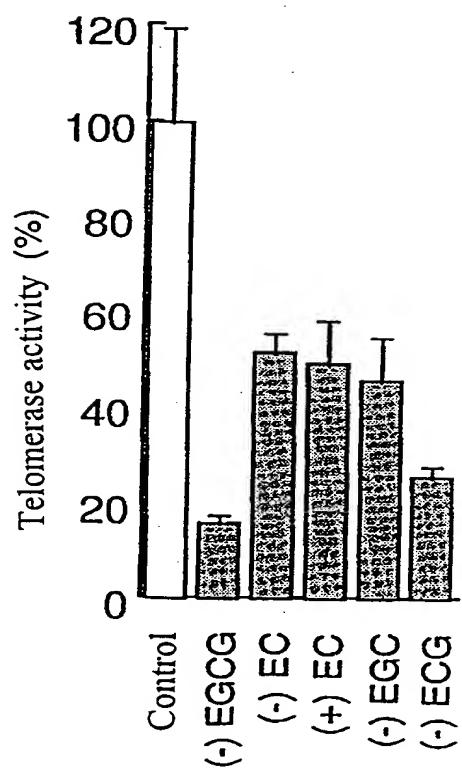
[Figure 6]

Figure shows the effect of EGCG on cell growth.

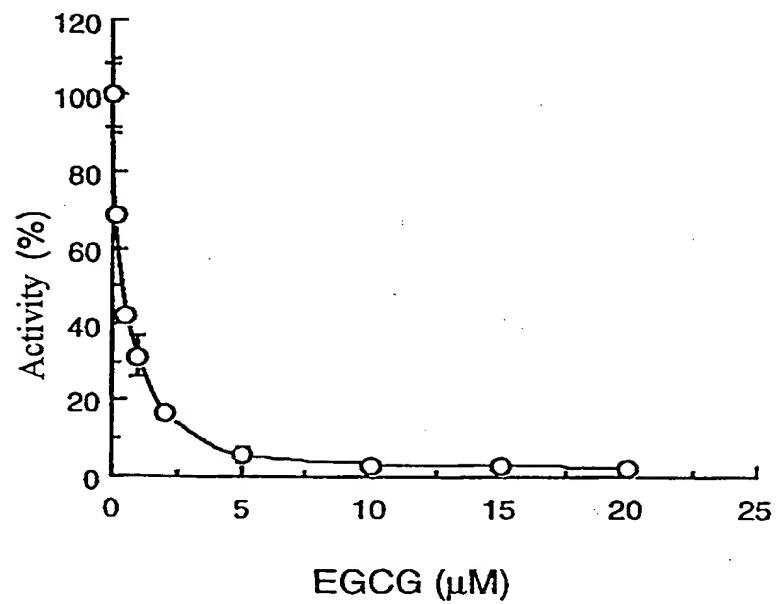
[Figure 7]

Figure shows the distribution of TRF lengths from HT29 cells at PD67 to PD70 in subcultures in the presence or absence of EGCG (15 μ M).

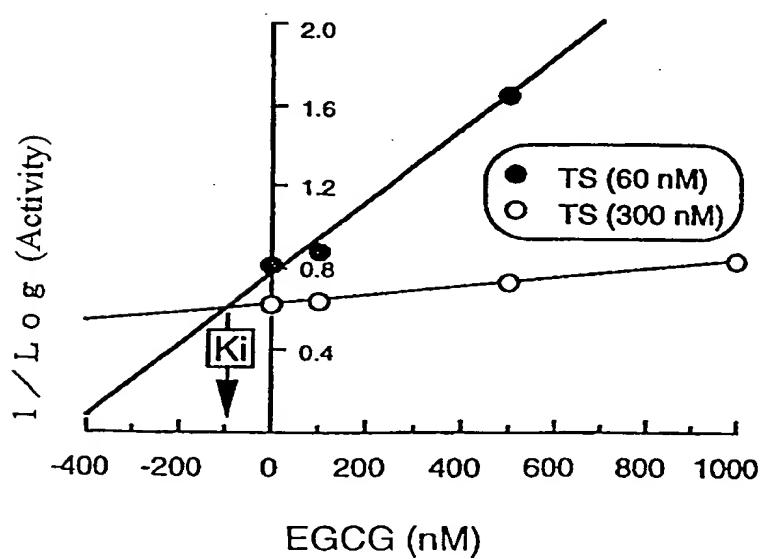
[Document Name] Drawings
[Figure 1]



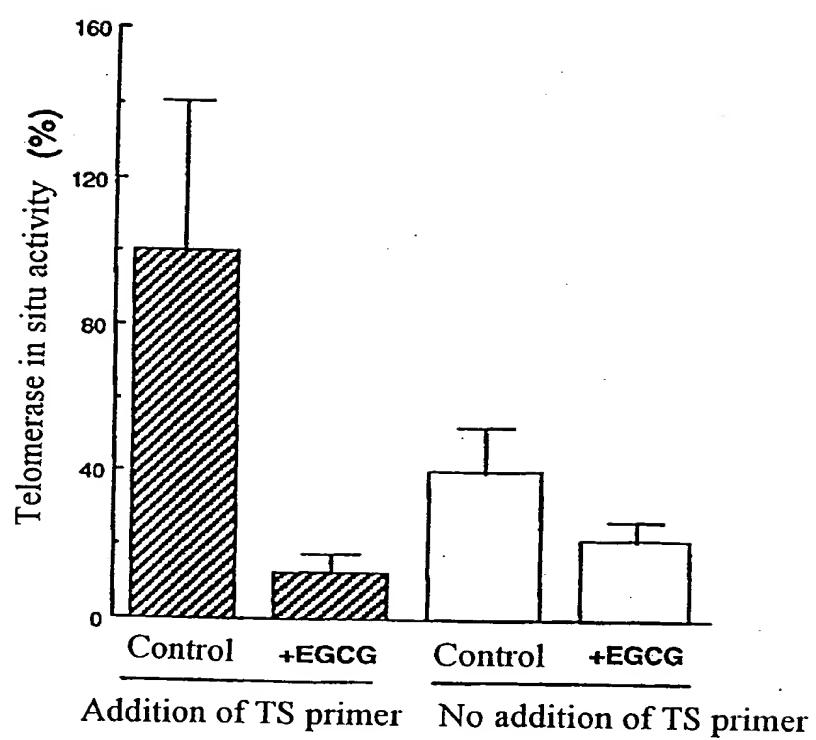
[Figure 2]



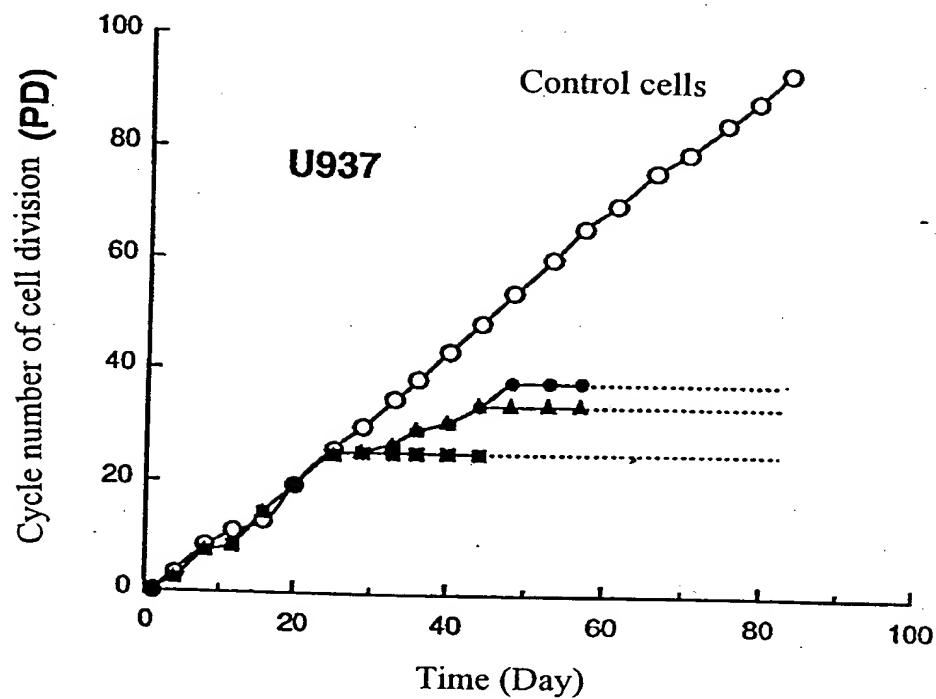
[Figure 3]



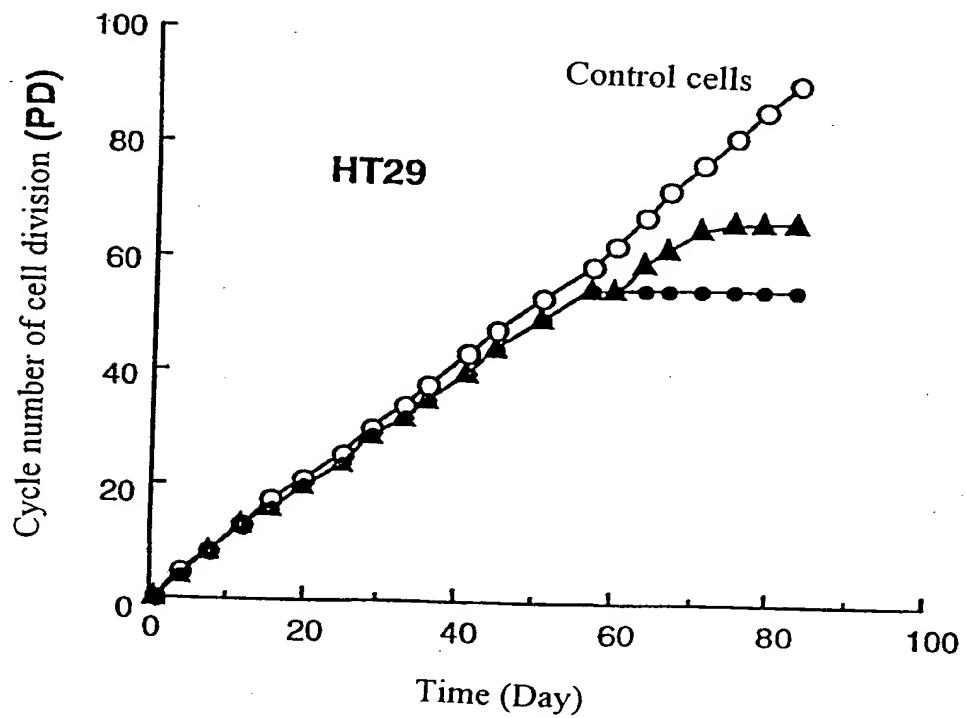
[Figure 4]



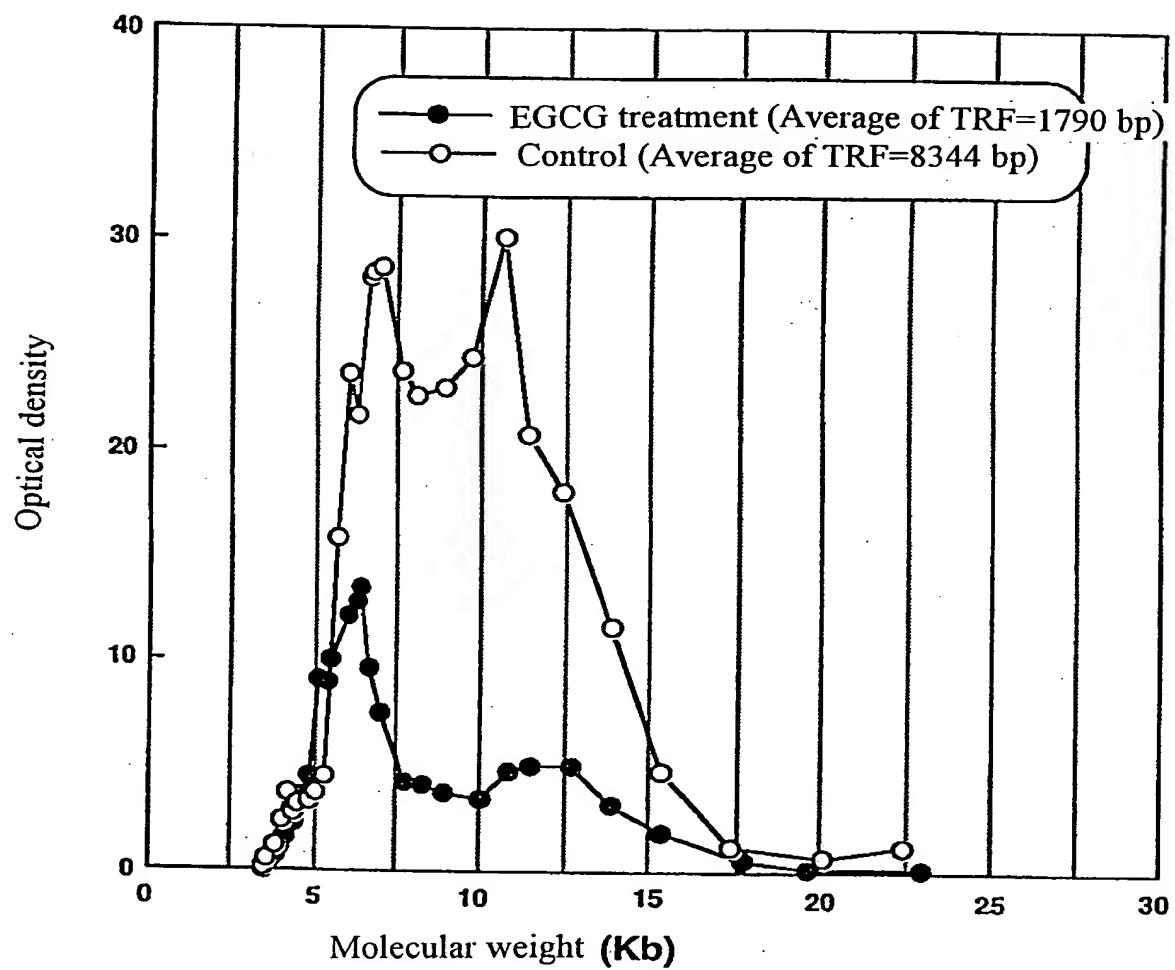
[Figure 5]



[Figure 6]



[Figure 7]



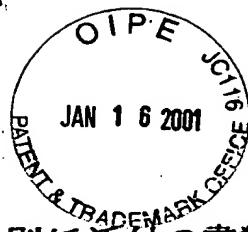
Abstract

[Abstract]

[Objects] The object is to provide a telomerase inhibitor which has telomerase inhibiting activity useful in providing an understanding of the involvement of telomerase with a cancer, and its prevention and treatment, and which possesses the safe and appropriate properties for pharmaceutical use.

[Means for achieving the object] A telomerase inhibitor is prepared by using catechins, in particular epigallocatechin gallate as an effective component.

[Selection of the drawing] Fig. 1



日本特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
る事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
h this Office.

出願年月日
Date of Application:

1997年12月26日

願番号
Application Number:

平成 9年特許願第361282号

願人
Applicant (s):

財団法人癌研究会

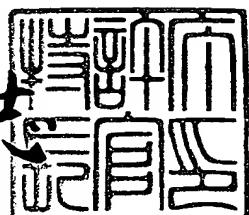
鶴尾 隆

株式会社 伊藤園

1998年12月25日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建



出証番号 出証特平10-3103414

【書類名】 特許願
 【整理番号】 P972431
 【提出日】 平成 9年12月26日
 【あて先】 特許庁長官 殿
 【国際特許分類】 C12N 9/00
 【発明の名称】 テロメレース阻害剤
 【請求項の数】 8
 【発明者】
 【住所又は居所】 東京都世田谷区宮坂3-36-6
 【氏名】 鶴尾 隆
 【発明者】
 【住所又は居所】 東京都豊島区東池袋2-6-2 ローヤルアネックス30
 1
 【氏名】 イマド ナサニ
 【発明者】
 【住所又は居所】 東京都足立区東和4-24-10-602
 【氏名】 清宮 啓之
 【発明者】
 【住所又は居所】 東京都杉並区南荻窪4-8-13
 【氏名】 菅野 晴夫
 【特許出願人】
 【識別番号】 000173588
 【氏名又は名称】 財団法人 癌研究会
 【特許出願人】
 【識別番号】 591031452
 【氏名又は名称】 鶴尾 隆
 【特許出願人】
 【識別番号】 591014972
 【氏名又は名称】 株式会社 伊藤園

【代理人】

【識別番号】 100070219

【弁理士】

【氏名又は名称】 若林 忠

【電話番号】 03-3585-1882

【選任した代理人】

【識別番号】 100100893

【弁理士】

【氏名又は名称】 渡辺 勝

【選任した代理人】

【識別番号】 100088328

【弁理士】

【氏名又は名称】 金田 輝之

【選任した代理人】

【識別番号】 100106138

【弁理士】

【氏名又は名称】 石橋 政幸

【選任した代理人】

【識別番号】 100106297

【弁理士】

【氏名又は名称】 伊藤 克博

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015129

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 テロメレース阻害剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 カテキンを有効成分とすることを特徴とするテロメレース阻害剤。

【請求項 2】 カテキンが、エピガロカテキンガレート、エピガロカテキン、エピカテキンガレートまたはエピカテキンである請求項 1 に記載のテロメレース阻害剤。

【請求項 3】 薬学的に許容される担体または希釈剤を含む請求項 1 または 2 に記載のテロメレース阻害剤。

【請求項 4】 カテキンを 90~95 重量%含む請求項 1~3 のいずれかに記載のテロメレース阻害剤。

【請求項 5】 カテキンを有効成分とすることを特徴とする癌予防または制癌剤。

【請求項 6】 カテキンが、エピガロカテキンガレート、エピガロカテキン、エピカテキンガレートまたはエピカテキンである請求項 5 に記載の癌予防または制癌剤。

【請求項 7】 薬学的に許容される担体または希釈剤を含む請求項 5 または 6 に記載の癌予防または制癌剤。

【請求項 8】 カテキンを 90~95 重量%含む請求項 5~7 のいずれかに記載の癌予防または制癌剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、カテキンを有効成分とし、癌予防剤、抗癌剤、癌進展遅延剤等として有用なテロメレース阻害剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

癌治療においては、種々の外科的な処置、内科的な処置及び放射線学的抗腫瘍

療法、あるいはこれらの各種処置の組合せが開発されている。更に、癌の発生を予防するための方法や、すでに発生した癌でもその進行をできるだけ遅延させて、致命的な状態への推移を防止する予防医学的な処置についての研究も盛んにおこなわれるようになってきている。いずれにしても、癌の発生から進行に至るメカニズムを更に解明することは効果的な癌の予防及び治療のための方法を開発する上で必須の要件となっている。

【0003】

癌治療における新しいターゲットとしての1つとしては、最近になってテロメレースという酵素の存在が注目されるようになった。このテロメレースは、逆転写酵素の1つで細胞増殖における染色体の安定性に関与しているテロメアDNA（以下テロメアという）の合成を行う酵素である。このテロメアは、染色体の末端に直鎖状のDNAにより形成された部分であり、テロメアが存在することで染色体自身を安定化させ、染色体同士の結合による変異等を防止している。

【0004】

テロメアに関しては、ヒト組織でのテロメアが年齢とともに短縮していくことに加えて、テロメアの短縮が進むと細胞が死滅することが解明され、テロメアの老化や細胞の分裂寿命との関係が明らかにされつつある。また、癌細胞におけるテロメアが周囲の正常細胞に比較して短い等の報告もあり、テロメアは癌研究の対象として注目を集めるものとなった。

【0005】

更に、全癌種の85%に当る癌におけるテロメア合成酵素であるテロメレース活性の検出が報告された〔例えば、Kim, N. W. et al, Science, 266, 2011-2015 (1994); Healy, K. C., Oncol. Res., 7, 121-130 (1995); Raymond, E. et al, Biotechnology, 7, 583-591 (1996)〕。これとは対照的に、殆どの正常体細胞はテロメレース陰性であることがわかっている。こうした背景から、テロメア及びテロメレースは、癌治療における強力なターゲットとして更に注目されるに至っている。

【0006】

一方、茶と癌予防作用や抗癌作用に関する研究に関しては、ヤングら [Yan g, C. S. & Wang, Z-Y, J. Natl. Cancer Inst., 85, 1038-1049 (1993)] 及びフジキら [Fujiki, H. et al, Nutrition reviews, 54, 67-70 (1996)] には、疫学的立場からみた緑茶の制癌効果に関する総説が記載されている。また、リアオら [Liao, S. et al, Cancer Letter 96, 239-243 (1995)] には、実験腫瘍ヌードマウスにおける茶に含まれるエピガロカテキンガレート (EGCG) の癌細胞増殖抑制効果が報告されている。更に、タニグチら [Taniguchi, S. et al, Cancer Letters, 65, 51-54 (1992)] には、EGCGの経口投与による悪性黒色種細胞の転移抑制が報告されている。しかしながら、これらの文献のいずれにおいても、緑茶あるいはEGCGの癌に対する作用機構についてはなんら記載されていない。特に、これらの文献は、緑茶やEGCGのテロメレースに対する作用や、テロメレースに関連した制癌作用のメカニズムについてなんら記載しないものである。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

癌細胞におけるテロメレース活性を阻害すると、癌細胞自身の有する染色体の安定性が低下し、癌細胞の寿命を短縮化できるとの仮説に基づいて、テロメレース阻害剤の癌治療への応用が期待されるが、有効なテロメレース阻害活性を有し、かつ医薬用としての特性を満足し得る物質についての報告は未だなく、更には、テロメレース阻害剤の使用によって癌細胞寿命の効果的な短縮化に成功した例についての報告もないのが現状である。

【0008】

本発明の目的は、テロメア及びテロメレースと癌との関係の解明や、癌予防及び癌治療において有用なテロメレース阻害活性を有し、医薬用としての安全性や好適な特性を有するテロメレース阻害剤を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明のテロメレース阻害剤は、カテキンを有効成分として含有することを特徴とする。本発明のテロメレース阻害剤は、テロメレース阻害自体あるいはテロメレース阻害を利用した各種の実験に用いる試薬として、更には、医薬用としての形態を付与することで、癌予防剤、抗癌剤等として利用することができる。なお、本発明のテロメレース阻害剤を用いることで、癌細胞の寿命を短縮して死滅させたり、癌増殖・悪性化の遅延による癌進行の抑制等の効果を得ることが可能である。

【0010】

【発明の実施の形態】

本発明においてテロメレース阻害剤の有効成分として利用するカテキンは、市販のものや、公知の方法によって茶から抽出分離したものを利用することができる。

【0011】

茶からの抽出分離は、例えば、茶葉を熱水または親水性有機溶媒で抽出処理して得られる抽出物からカフェイン等の天然高分子類をクロロホルムで抽出除去し、更に酢酸エチル等の有機溶媒で抽出処理することで茶カテキンの混合物を得た後、この混合物からアセトンなどの親水性有機溶媒を溶出用剤として用いたカラムクロマトグラフィーによってカテキンを分離することができる。

【0012】

本発明において用い得るカテキンとしては、例えば、(-)エピガロカテキンガレート(EGCG: epigallocatechin gallate)、(-)ニピガロカテキン(EGC: epigallocatechin)、(-)ニピカテキンガレート(ECG: epicatechin gallate)及び(-)又は(+)エピカテキン(EC: epicatechin)等を挙げることができ、本発明の効果が得られる範囲内でこれらの誘導体も利用できる。これらのカテキンの中では、エピガロカテキンガレート及びエピカテキンガレートが好ましく、エピガロカテキンガレートが特に好ましい。

【0013】

本発明におけるテロメレース阻害剤は、有効成分としてのカテキンに、必要に

応じて適当な媒体に含有させて調製することができる。例えば、植物油、乳化剤 (Tween、Emulgene等)、アスコルビン酸（抗酸化剤）を用いてカテキンをO/W (oil-in-water) 型エマルジョン中に含有させ、これを凍結乾燥したものが好適に利用できる。乾燥凍結前の状態での配合の具体例としては、植物油及び乳化剤等を合計で5重量%、抗酸化剤を0.1重量%、カテキンを5重量%含有させたものを挙げることができる。阻害剤中のカテキンの含量は好ましくは90～95重量%とし、必要に応じて希釈して用いることができる。

【0014】

テロメレース阻害作用を有するカテキンを活性成分として配合した医薬組成物は、癌予防剤及び制癌剤として好適に利用できる。この制癌剤の作用には、癌細胞を直接攻撃して死滅させる抗癌作用や癌進展（悪性化）を遅延する作用等も含まれる。このような医薬組成物として利用する場合には、カテキンを有効成分として常法によって治療目的に応じた各種の形態とすることができます。医薬組成物の形態としては、例えば、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、坐薬等の固形製剤、注射剤、懸濁剤、シロップ剤、乳剤等の液体製剤、貼剤等の半固体剤等を挙げることができる。

【0015】

医薬組成物として利用する場合の有効成分であるカテキンの含有量は、例えば錠剤もしくはカプセル剤の剤形で、100～500mg（剤形の総重量あたり90～95重量%）程度とすることができます。医薬組成物として利用する場合の投与量は、処置目的、処置対象の状態等に応じて適宜選択されるが、例えば、有効成分化合物の量として、例えば、成人1日当たり500～2000mg程度とすることができます。また、上述したO/W型のエマルジョンの凍結乾燥物は製剤として、更には製剤の原料としても好適に利用できる。

【0016】

また、本発明における医薬組成物には、カテキンの所望とする作用を阻害しない範囲内で、製剤において用いられている種々の添加剤を含有させることができます。更に、本発明のテロメレース阻害剤を用いた癌治療においては、テロメレ

ス阻害剤によってダメージを受けている癌細胞に対して化学療法剤（抗癌剤）等を併用することで、更に効果的な癌治療を達成することも可能である。

【0017】

本発明のテロメレース阻害剤の有効成分のカテキンは、茶の成分中から得られるものであり、安全性も高く、しかも少量で有効な活性を得ることができ、医薬用として、特にテロメレースを発現している癌に対する予防用、あるいは治療用の医薬として極めて好適である。

【0018】

【実施例】

以下実施例により本発明を更に詳細に説明する。なお、「%」は特に指定のない限り「重量%」を示す。

【0019】

実施例1

(非細胞系でのテロメレース活性の測定)

EGCG、EGC、ECG及びEC（各シグマ社製）のテロメレース阻害活性を、キムら [Kim, N. W. et al, Science, 266, 2011-2015 (1994)] に記載のTRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) 法に従って以下に示す操作によって測定した。

(1) 細胞抽出液の調製

細胞を氷冷PBS（リン酸緩衝生理食塩水）で洗浄した後、再度PBSに懸濁して細胞数を算定した。この細胞懸濁液を遠心して得た細胞塊をTRAPアッセイ緩衝液 [10 mM Tris-HCl、pH 7.5、1 mM MgCl₂、1 mM EDTA、0.5% CHAPS、10% グリセリン、5 mM 2-メルカプトエタノール、0.1 mM 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride hydrochlorine: 4-(2-アミノエチル)-ベンゼンスルホニル フルオライド ハイドロクロライド] に懸濁した後、液体窒素にて急速冷凍した。これを融解後氷浴にて30分間静置して抽出処理を行い、得られた抽出液を遠心して上清を活性測定用細胞

抽出液として採取した。

(2) 反応及び反応後の処理

一定量（細胞200～1000個分に相当）の細胞抽出液に、試験化合物、T Sプライマー（50ng）と50μMのd N T P s及びT 4 g 3 2蛋白質（ベーリンガーマンハイム社）を加え、20℃で30分間インキュベートした。反応終了後、反応液にC Xプライマー（100ng）及びP C Rの内部標準としてI T A S（10⁻¹⁸g）を加え、A m p l i T a q DNAポリメラーゼ（2U）の存在下で、（94℃40秒→50℃40秒→72℃60秒）×35サイクル→72℃2分の条件でP C Rを行いP C R産物を得た。

【0020】

なお、上記の操作で用いたプライマーの有する塩基配列は以下のとおりである。

T S プライマー：

5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'（配列番号：1）

C X プライマー：

5'-GTGCCCTTAACCCCTTACCCCTTACCCCTAA-3'（配列番号：2）

I T A S：

5'-AATCCGTCGAGCAGAGTTGTGAATGAGGCCTTCGAGGCTCTGAAGAGAAGCACCCTGCTAACCCCAAC
CAGCGGCTGCCCTAACGGTGGAGATCCTGCCAGTGCCATCCAGTACATTGAGCCCTATTAGGGTAAGGGTAA
GGGTAAGGG-3'（配列番号：3）

i n v i t r oの反応系においてテロメレースはT S プライマーの3'末端にテロメアを付加合成する。C X プライマーの3'末端側24塩基のうち21塩基がテロメア配列と一致し、T S プライマーとC X プライマーの組合せでP C Rを行うことによりテロメア産物を増幅することができる。I T A S配列の5'末端部及び3'末端部は、それぞれT S プライマー及びC X プライマーの配列と一致させてある。

(3) 反応生成物の検出・定量

上記の操作で得られたP C R産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた後、S Y B R グリーン（宝酒造社）で染色してD N AのバンドをU V トランスイ

ルミネーター照射下で検出した。なお、検出されたバンドは写真撮影しておいた。各バンドの強さをNIH Image 1.60ソフトウェアで定量化し、ITASフラグメントのバンド（対照）との相対強度をテロメレース活性値とした。

【0021】

得られた結果を図1に示す。図1から、5種のカテキンのなかでは、EGCGが最も強力な阻害活性を有することがわかる。

【0022】

実施例2

(EGCGのテロメレース阻害活性)

EGCGの反応液中の濃度を、0.1~20 μMの範囲において8段階で変化させて、各濃度でのテロメレース活性を、プライマーとしてTSを2種の異なる濃度で用いる以外は、実施例1と同様にしてEGCGの各濃度におけるテロメレース活性を測定した。得られた結果を図2に示す。図2の結果から測定値のディクソンプロットを行い、Ki値を求めたところ約100 nMであった（図2、3参照）。

【0023】

実施例3

(細胞内におけるテロメレース阻害活性)

单芽球白血病細胞 (monoblastoid leukaemia cell 1) U937 (ATCC: アメリカン タイプ カルチャーライブラリーコレクション) 及び結腸腺癌細胞 (colon adenocarcinoma cell 1) HT29におけるEGCGのテロメレース活性阻害を調べた。

【0024】

U937細胞用の培地としては、RPMI1640培地（ニッスイ社）に10%FBS (fetal bovine serum) を追加したものを、HT29細胞としてはRPMI1640培地に5%FBS及び5%FCS (fetal calf serum) を追加したものをそれぞれ用いた。

【0025】

15 μMのEGCG溶液中で各細胞を2時間インキュベートして処理してから、PBS中で洗浄した。洗浄した細胞を、RPMI1640培地（血清を含有しないもの）に 2×10^6 個/mlの濃度で懸濁させ、これにストレプトリジンO（シグマ社製、5U/ml）、TSプライマー（10 μM）、スペルミジン（1 mM）及びイミプラミン（100 μM）を添加して、室温で10分間インキュベートした。なお、ストレプトリジンOは細胞内への物質の膜透過性を向上させる物質であり、これによってTSプライマー等が細胞内に取り込まれる。

【0026】

透過反応を10%FBSを含む同一培地の同量添加によって停止させてから、更に1時間細胞懸濁液を室温でインキュベートして細胞膜をシールした。こうして得られたTSプライマー等が取り込まれている細胞を、室温で1時間インキュベートして細胞膜被覆を行うと同時に、細胞内テロメレース反応を進行させた。次に、細胞をPBSで2回洗浄してからペレット化した後、冷凍処理してからTRAP法によるテロメレース産物の検出に用いた。

【0027】

すなわち、細胞を冰冷PBSで洗浄した後、再度PBSに懸濁して細胞数を算定した。この懸濁液を遠心して得た細胞塊をTRAPアッセイ緩衝液に懸濁した後、液体窒素にて急速冷凍した。これを融解後冰浴にて30分静置し、得られた抽出液を遠心してその上清を細胞抽出液として採取した。一定量（細胞200～1000個分に相当）の細胞抽出液にTSプライマー（344 nM）とACXプライマー（385 nM）、50 μMのdNTPs、T4 g32蛋白質（ベーリンガーマンハイム社）、PCRの内部標準としてTSNT（0.02 pM）及びNTプライマー（385 nM）を加え、AmpliTaq DNAポリメラーゼ（2U）の存在下で、（94℃40秒→50℃40秒→72℃60秒）×35サイクル→72℃2分の条件でPCRを行いPCR産物を得た。

この反応の使用したプライマーの有する塩基配列は以下のとおりである。

ACXプライマー：

5'-GCGCGGCTTACCCCTTACCCCTTACCCCTAACCG-3'（配列番号：4）

TSNT：

5'-AATCCGTCGAGCAGAGTTAAAAGGCCGAGAAGCGAT-3' (配列番号: 5)

N T プライマー:

5'-ATCGCTTCTCGGCTTTT-3' (配列番号: 6)

【0028】

このようにして得られた P C R 産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた後、これを S Y B R グリーン（宝酒造社）で染色して D N A のバンドを U V トランスイルミネーター照射下で検出した。各バンドの強さを N I H I m a g e 1. 60 ソフトウェアで定量化し、 I T A S フラグメントのバンド（対照）との相対強度をテロメレース活性値とした。

【0029】

なお、上記の P C R は、テロメレースによって伸長化された部分を、 T S プライマーを P C R での前方向伸長用プライマーとして、 A C X プライマーを逆方向伸長用プライマーとしてそれぞれ用いたものである。また、 3 6 b p の内部標準（ T S N T ）及びそれ自身の逆方向伸長用プライマー（ N T ）は、キムラ [(K i m, N. W. & Wu, F. , N u c l e i c A c i d s R e s. , 2 5 , 2 5 9 5 - 2 5 9 7 (1 9 9 7)] の記載に従って使用した。

【0030】

得られた結果を図 4 に示す。図 4 の結果から、細胞を E G C G で処理することによって細胞内テロメレース活性が顕著な阻害を受けたことがわかる。なお、 T S プライマー非存在下においてもシグナルが若干検出されたが、これは内因性テロメア配列などに由来するものであると予想され、 E G C G 処理で同様に減少した。

【0031】

実施例 4

(E G C G のテロメレースへの作用機構)

細胞を $15 \mu M$ の E G C G で 2 時間処理した後、氷冷 P B S で洗浄した。遠心して得た細胞塊を T R A P アッセイ緩衝液に懸濁した後、液体窒素で急速冷凍した。これを融解後氷浴にて 30 分間静置し、得られた抽出液を遠心して上清を細胞抽出液として採取した。一定量（細胞 200 ~ 1000 個分に相当）の細胞抽

出液に、試験化合物、TSプライマー(50ng)と50μMのdNTPs及びT4g32蛋白質(ベーリンガーマンハイム社)を加え、20℃で30分間インキュベートした。反応終了後、反応液にCXプライマー(100ng)を加え、AmpliciTaq DNAポリメラーゼ(2U)及びiTAS(10⁻¹⁸g)の存在下で、(94℃40秒→50℃40秒→72℃60秒)×35サイクル→72℃2分の条件でPCRを行いPCR産物を得た。このPCR産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた後、SYBRグリーン(宝酒造社)で染色してDNAのバンドをUVトランスイルミネーター照射下で検出した。各サンプルのバンドの強さをNIH Image 1.60ソフトウェアで定量化し、iTASフラグメントのバンドとの相対強度をテロメレース活性値とした。

【0032】

以上の操作をU937細胞及びHT-29細胞のそれぞれについて行ったところ、これらの細胞のいずれにおいても、EGCG処理はin vitroテロメレース活性に影響を与えたなかった。このことと、実施例1～3の結果から、EGCGは細胞内で直接的かつ可逆的にテロメレース活性を阻害し、この阻害は細胞内情報伝達機構を介するものではないことが明らかになった。

【0033】

実施例5

U937細胞及びHT29細胞のそれぞれについて、EGCGを含む培地と含まない培地での継代培養を行い、EGCG添加の細胞増殖への影響を調べた。培地としては実施例3と同様のものを用いた。

【0034】

U937細胞については5つの継代培養系列を作成し、HT29細胞については9つの継代培養系列を作成した。各系列の最初の培養は、保存細胞株からの細胞を10cm培養皿あたり 5×10^5 個の細胞数で播種して行った。各細胞の1系列についてはEGCGを追加していない培地で培養した対照系列とし、残りの系列についてはEGCGを15μM追加した培地で培養した。

【0035】

4日毎に細胞の植え継ぎとサンプリングを行い、細胞数の計測を行った。培地

については毎日新鮮なものと交換した。

【0036】

得られた結果を図5 (U937細胞) 及び図6 (HT29細胞) に示す。-○-はEGCGを含まない培地で培養した対照系列であり、図5における- -、-▲-及び-■-は、15μMのEGCGを含んだ培地で培養した系列群であり、いずれも53日(-●-)、44日(-▲-)、29日(-■-)でクライシスに入った後、老化細胞と類似の形態を示した。図6における-▲-及び-●-は、15μMのEGCGを含んだ培地で培養した系列群であり、いずれも75日(-▲-)、57日(-●-)でクライシスに入った後、老化細胞と類似の形態を示した。

【0037】

細胞形態との関連においては、U937細胞ではPD25付近で、HT29細胞ではPD60付近で独特な細胞形態の変化 (U937細胞では細胞形状が丸みを帯び、個々の細胞が独立で存在するようになり、HT29細胞ではプラズマ膜に損傷が見られる) を示すクライシスに入り、U937細胞では、PD40までに、HT29細胞ではPD70までに死滅に至った。なお、PDは、細胞の増殖における細胞個数が倍増するサイクル数であり、血球計算板を用いて細胞数をモニタリングすることによって算出した。

【0038】

細胞の形態変化が一次的でないことは、形態変化を生じた細胞をEGCGを含まない培地に移して培養しても細胞の形態はもとの状態に戻らず、形態の変化が維持されたことによって確認した。

【0039】

クライシスにあるPD57~60の間のHT29細胞を集め、ゲノムDNAを塩析/エタノール析出法 (ストラテゲン社製: Stratagene) によって調製した。なお、単離されたゲノムDNAが分解等を受けていないことはゲル電気泳動法 (エチジウムプロマイド染色) で確認した。

【0040】

単離したゲノムDNA (10μg) をHinf I及びRsa Iで消化し、得ら

れた消化物のサザンブロティングを常法に従って行った後、Tel o Quant アッセイキット（ファルミンジエン社製：PharmMingen）を用いてDNA断片の検出を行った。

【0041】

得られた結果を図7に示す。通常のゲノムDNAには制限酵素Hinf I及びRsa Iによって切断を受ける部位が非常に多数存在するが、サブテロメア～テロメア領域においてはこのような切断部位は存在していない。従って、ゲノムDNAを上記の制限酵素によって消化すれば、テロメア領域のみが未消化のまま残ることになる。このDNA断片をTRF (terminal restriction fragment) と呼び、サザンプロット法でこれを検出することによって細胞のテロメア長を観察することが可能である。EGCG処理または非処理のHT-29細胞について上記の操作で得られたTRFをTel Quantアッセイキットを用いて検出した。得られたシグナルについてデンシドメトリー解析を行った結果が図7である。EGCG処理によってクライシス期に入った細胞（-●-）では、非処理の細胞（-○-）に対して約1.1kbのTRF短縮が認められた。更に、EGCG処理細胞では、連続処理がHT-29細胞でのテロメア縮退を起すことが明らかとなった。

【0042】

また、フローサイトメトリーを用いた常法によってクライシスに入る前の細胞についてのDNA含有量の分析をしたところ、U937細胞及びHT29細胞とともに、異数倍体細胞の50～100%の増加、細胞周期G2/Mフラクションの10～20%の増加がそれぞれ見られた。

【0043】

これらの結果を総合すると、EGCGによる細胞内でのテロメレース阻害が、細胞がクライシスから死滅に至った原因であることは明白である。

【0044】

【発明の効果】

本発明において用いられるカテキンは、従来にない強力なテロメレース阻害活性を有するものであり、本発明によってテロメレースと癌との関係の解明において

て有用なテロメレース阻害剤や、癌予防及び癌治療において有用なテロメレース阻害活性を有し、医薬用としての安全性や好適な特性を有するテロメレース阻害剤を提供することができる。

【0045】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の特徴：PCR用TSプライマー

配列

AATCCGTCGA GCAGAGTT 18

配列番号：2

配列の長さ：28

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の特徴：PCR用CXプライマー

配列

GTGCCCTTAA CCCTTACCCCT TACCCCTAA 28

配列番号：3

配列の長さ：150

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の特徴：P C R用内部標準 I T A S

配列

AATCCGTCGA GCAGAGTTGT GAATGAGGCC TTCGAGGCTC TGAAGAGAAG CACCCCTGCTC 60

AACCCCAACC AGCGGCTGCC TAAGGTGGAG ATCCTGCGCA GTGCCATCCA GTACATTGAG 120

CGCCTATTAG GGTAAGGGTA AGGGTAAGGG 150

配列番号：4

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成D N A

配列の特徴：P C R用A C Xプライマー

配列

GCGCGGCTTA CCCTTACCCCT TACCCCTAACCC 30

配列番号：5

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成D N A

配列の特徴：P C R用内部標準T S N T

配列

AATCCGTCGA GCAGAGTTAA AAGGCCGAGA AGCGAT 36

配列番号：6

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成D N A

配列の特徴：P C R用N T プライマー

配列

ATCGCTTCTC GGCCTTT 18

【図面の簡単な説明】

【図 1】

各化合物のテロメレース活性を示す図である。

【図 2】

E G C G 濃度に応じてテロメレース活性の変化を示す図である。

【図 3】

E G C G のテロメレース活性阻害に関するディクソンプロットを示す図である

【図 4】

E G C G の細胞内でのテロメレース阻害活性を示す図である。

【図 5】

E G C G の細胞増殖への影響を示す図である。

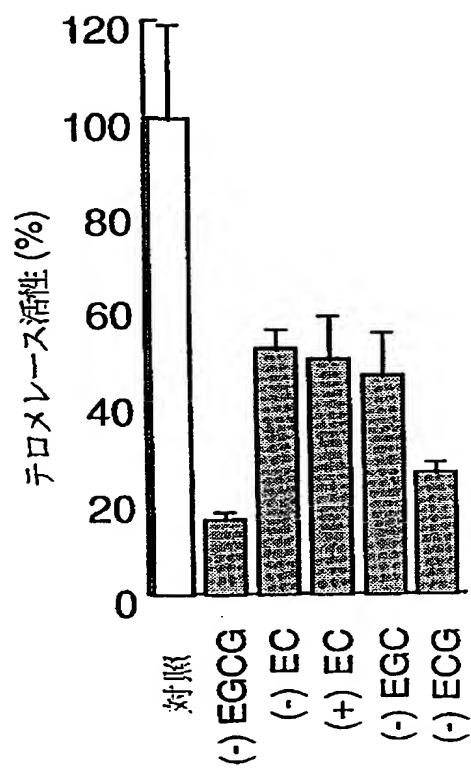
【図 6】

E G C G の細胞増殖への影響を示す図である。

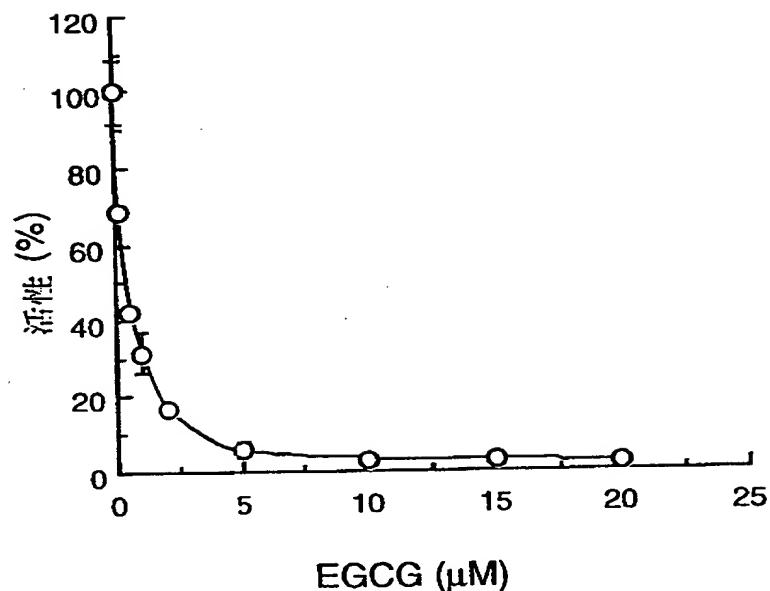
【図 7】

E G C G (15 μ M) の存在下または非存在下での継代培養時におけるP D 6
7~70のH T 29細胞からのT R Fの長さの分布を示す図である。

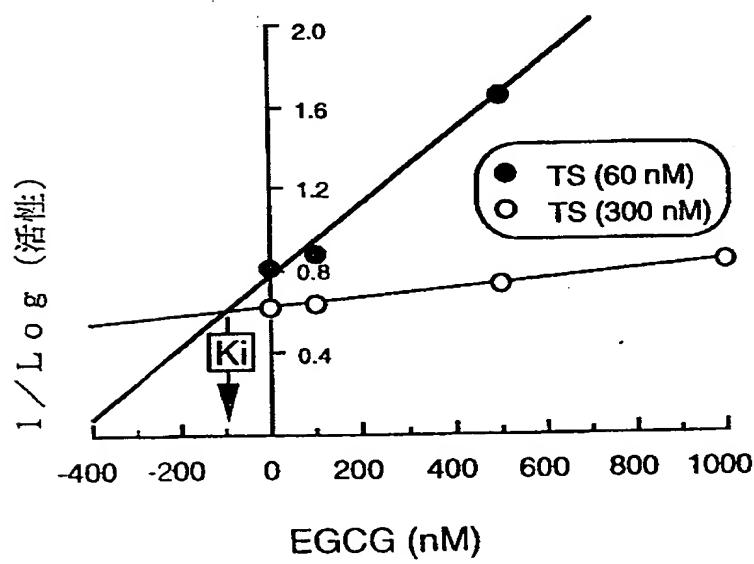
【書類名】 図面
【図 1】



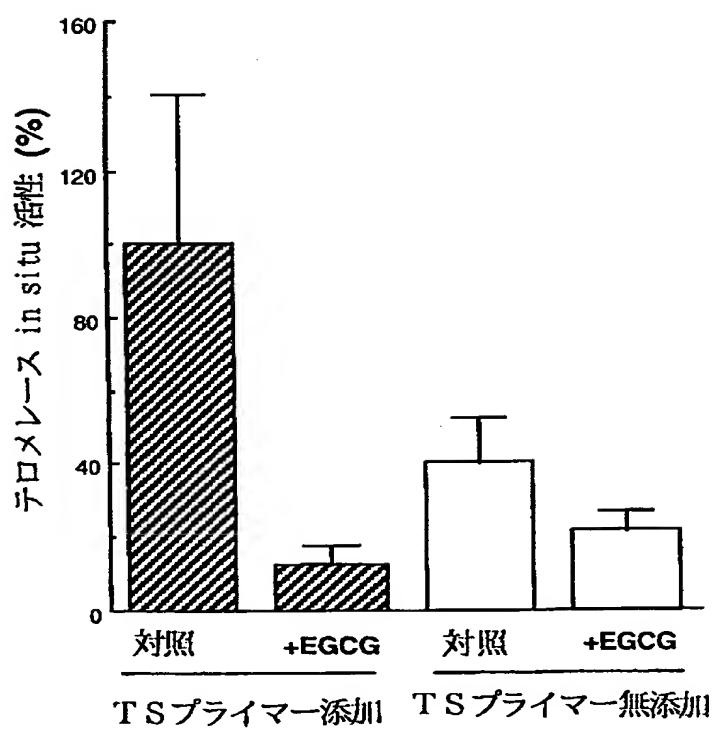
【図2】



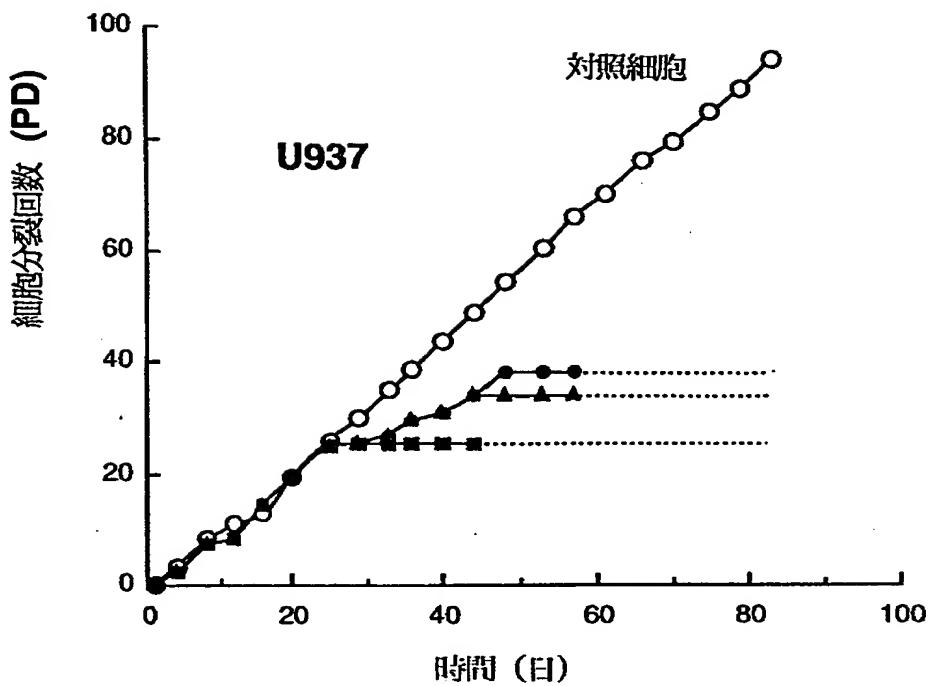
【図3】



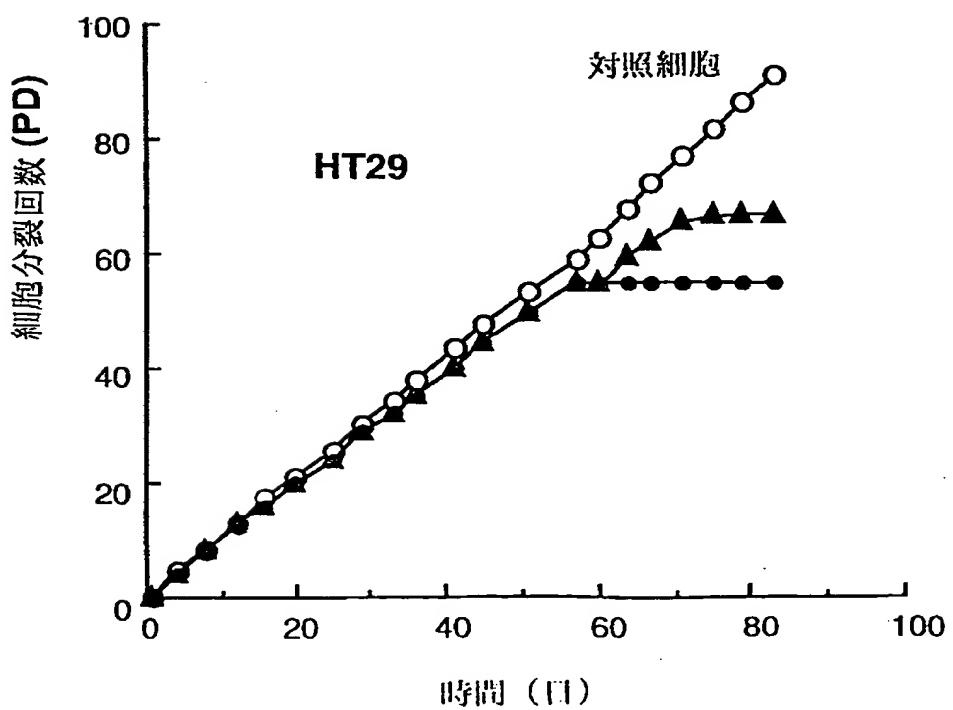
【図4】



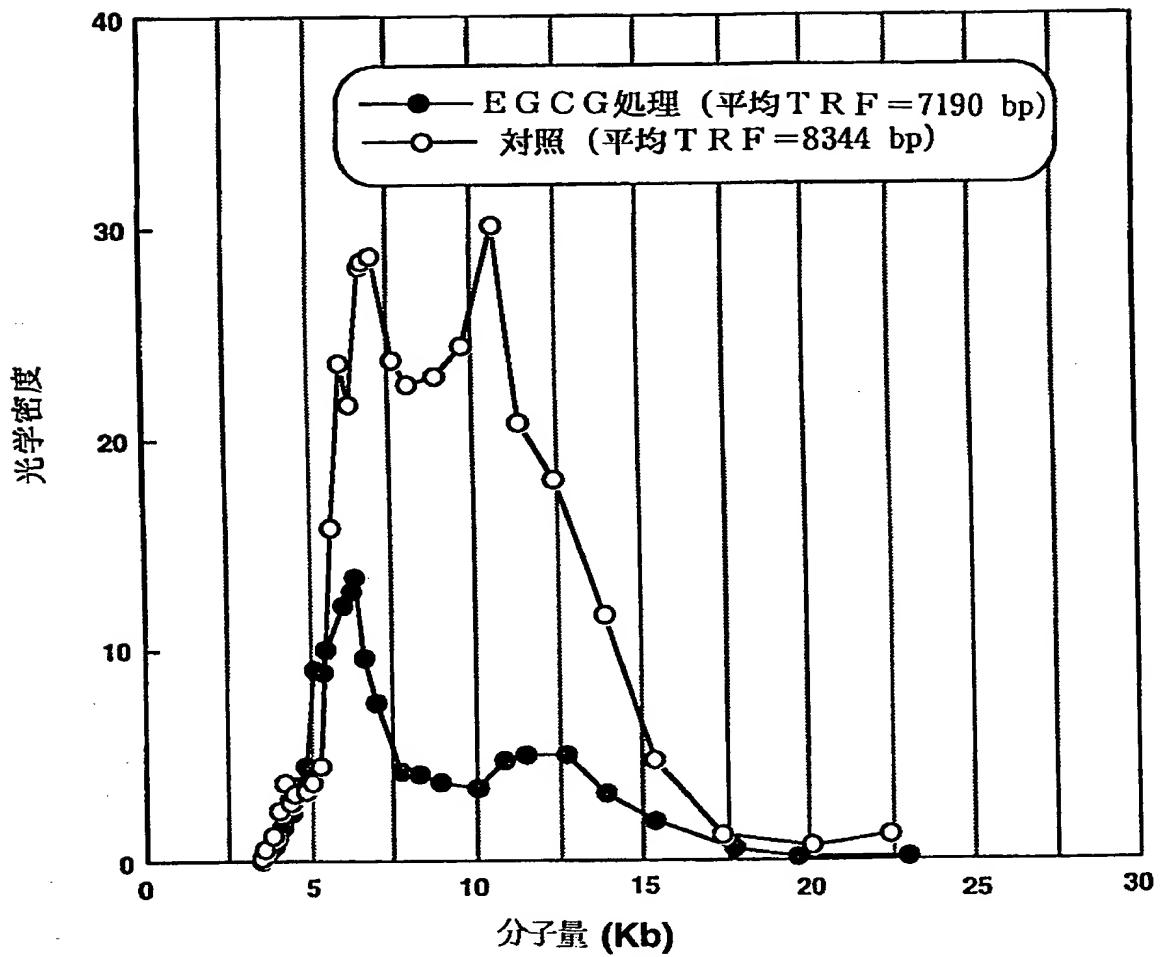
【図5】



【図6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 テロメア及びテロメレースと癌との関係の解明や、癌予防及び癌治療において有用なテロメレース阻害活性を有し、医薬用としての安全性や好適な特性を有するテロメレース阻害剤を提供することにある。

【解決手段】 カテキン、なかでもエピガロカテキンガレートを有効成分としてテロメレース阻害剤を構成する。

【選択図】 図 1

【書類名】 職権訂正データ
 【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000173588
 【住所又は居所】 東京都豊島区上池袋1丁目37番1号
 【氏名又は名称】 財団法人癌研究会

【特許出願人】

【識別番号】 591031452
 【住所又は居所】 神奈川県南足柄市塚原4828-15
 【氏名又は名称】 鶴尾 隆

【特許出願人】

【識別番号】 591014972
 【住所又は居所】 東京都渋谷区本町3-47-10
 【氏名又は名称】 株式会社 伊藤園

【代理人】

【識別番号】 100070219
 【住所又は居所】 東京都港区赤坂1丁目9番20号 第16興和ビル
 【氏名又は名称】 8階 若林国際特許事務所
 若林 忠

【選任した代理人】

【識別番号】 100100893
 【住所又は居所】 東京都港区赤坂1丁目9番20号 第16興和ビル
 【氏名又は名称】 8階 渡辺 勝

【選任した代理人】

【識別番号】 100088328
 【住所又は居所】 東京都港区赤坂1丁目9番20号 第16興和ビル
 【氏名又は名称】 8階 金田 暢之

【選任した代理人】

【識別番号】 100106138
 【住所又は居所】 東京都港区赤坂1丁目9番20号 第16興和ビル
 【氏名又は名称】 8階 石橋 政幸

【選任した代理人】

【識別番号】 100106297

【住所又は居所】 東京都港区赤坂1丁目9番20号 第16興和ビル
8階 若林国際特許事務所
【氏名又は名称】 伊藤 克博

出願人履歴情報

識別番号 [000173588]

1. 変更年月日 1990年 8月 6日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都豊島区上池袋1丁目37番1号

氏 名 財団法人癌研究会

出願人履歴情報

識別番号 [591031452]

1. 変更年月日 1991年 1月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 神奈川県南足柄市塚原4828-15

氏 名 鶴尾 駿

出願人履歴情報

識別番号 [591014972]

1. 変更年月日 1992年 8月21日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都渋谷区本町3-47-10

氏 名 株式会社 伊藤園